

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 664 287

②1 N° d'enregistrement national : 90 08416

⑤1 Int Cl<sup>5</sup> : C 12 N 15/57, 15/70, 15/87, 9/64; C 07 K 13/00; A 61 K 37/64; C 12 Q 1/68, 1/37; G 01 N 33/68, 33/573

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 03.07.90.

③0 Priorité :

⑦1 Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE  
ET DE LA RECHERCHE MEDICALE établissement  
public — FR.

⑦2 Inventeur(s) : Llorens-Cortes Catherine, Giros Bruno,  
Pollard Hélène et Schwartz Jean-Charles.

④3 Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 10.01.92 Bulletin 92/02.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Ernest Gutmann Yves Plasseraud S.A.

⑤4 Nouveau polypeptide présentant une activité enzymatique, et gène codant pour ce polypeptide.

⑤7 L'invention concerne un polypeptide ayant une activité  
enzymatique contenant:

. la séquence de 255 acides aminés de la Figure 1,  
. ou un variant de cette séquence, ce variant étant tel  
qu'il résulte de l'addition, de la suppression ou du rempla-  
cement d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que  
le variant soit une métallopeptidase présentant la même  
spécificité que ladite séquence vis-à-vis de substrats et in-  
hibiteurs.

FR 2 664 287 - A1

NOUVEAU POLYPEPTIDE PRESENTANT UNE ACTIVITE  
ENZYMATIQUE, ET GENE CODANT POUR CE POLYPEPTIDE

-----

L'invention a pour objet de nouveaux polypeptides ayant une activité enzymatique et les gènes codant pour ces polypeptides.

L'enzyme enképhalinase (membrane métalloendopeptidase, EC 3.4.24.11 nom recommandé par la Commission des Enzymes) est responsable de l'inactivation de certains neuropeptides, tels que les enképhalines, et neurohormones, telles que le facteur natriurétique auriculaire (Schwartz, 1989, In : "Design of Enzym inhibitors as drugs", Ed. by M. Sandler and H.J. Smith, Oxford University Press New York, p. 206-220).

De ce fait, des inhibiteurs de cette enzyme ont reçu des applications thérapeutiques en gastroentérologie ou, encore, dans le domaine cardiovasculaire.

Un ADNC de cette enzyme a été cloné et sa séquence, ainsi que partiellement celle de son gène, ont été établis (Malfroy et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, 144, 59; Devault et al., EMBO J., 1987, 6, 1317; Shipp et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85, 1317).

La séquence de cette enzyme est constituée de 742 acides aminés.

la protéine enzymatique elle-même ou une séquence de celle-ci, privée de son segment cytoplasmique mais conservant une activité enzymatique non modifiée (attribuable au fragment extracellulaire) ont été proposés comme agents thérapeutiques (demande de brevet européen n° 272928).

L'enképhalinase qui fait notamment l'objet de la référence demande de brevet EP n° 272928 sera désignée dans la suite par "enképhalinase forme longue".

Or, l'invention repose sur le fait inattendu que partant de la séquence de l'enképhalinase de rat et utilisant par exemple les méthodes de Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction, il a été mis en évidence l'existence, insoupçonnée jusqu'alors, d'isoformes de cette enzyme.

La présente invention a également pour objet :

- des vecteurs contenant les gènes codant pour des polypeptides ayant une activité enzymatique correspondant aux isoformes de l'enképhalinase mentionnés ci-dessus,
- des cellules transformées pour exprimer les gènes susdits sur lesquelles il est possible d'évaluer l'activité enzymatique des susdits polypeptides,
- des sondes nucléotidiques susceptibles de s'hybrider avec les gènes codant pour les susdits polypeptides, lesquelles sondes seraient susceptibles d'être utilisées pour le diagnostic in vitro d'affections mettant en jeu un épissage alternatif anormal,
- des anticorps polyclonaux et monoclonaux dirigés contre les susdits polypeptides et utilisables dans un but analytique pour purifier lesdits polypeptides, dans un but de diagnostic in vitro, ou dans un but thérapeutique,
- des médicaments contenant comme substance active des inhibiteurs puissants de l'activité enzymatique des susdits polypeptides,
- un procédé d'identification de tissus où les susdits polypeptides sont exprimés de façon exclusive ou prédominante, pour la détermination ou la mise au point d'inhibiteurs de l'activité enzymatique des susdits polypeptides.

En particulier, le nouveau polypeptide de l'invention ayant une activité enzymatique :

- contient la séquence de 255 acides aminés de la Figure 1,

- ou contient des variants de cette séquence, qui résulte de l'addition, de la suppression ou du remplacement d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que le variant soit une métallopeptidase présentant la même spécificité que ladite séquence vis-à-vis de substrats et inhibiteurs.

Des variants avantageux de l'invention sont ceux qui hydrolysent des peptides naturels tels que la (Met)<sup>5</sup> enképhaline ou des substrats modèles tels que le succinyl-Ala-Ala-Phe-amidométhylcoumarine et dont l'activité peptidasique est inhibée par le thiorphan à 0,1mM sans être affecté par le thiorphan à 0,1μM.

Un polypeptide avantageux de l'invention est constitué par celui défini par la séquence d'acides aminés de la Figure 1, s'étendant de l'extrémité constituée par l'acide aminé en position 1 à celle constituée par l'acide aminé en position 255.

Ce polypeptide contient une séquence consensus de 8 acides aminés (86-93) qui est la caractéristique des peptido-hydrolases utilisant comme co-facteur un atome de Zn<sup>++</sup> (il contient un atome de zinc coordonné notamment par les restes histidine de cette séquence consensus). Ce polypeptide appartient donc à la classe des métallopeptidases (EC 3.4.). De plus, il possède un fragment d'acides aminés hydrophobes (22-44) permettant un ancrage dans les membranes plasmiques, ce qui indique qu'il s'agit vraisemblablement d'une enzyme membranaire.

Ce polypeptide possède un poids moléculaire d'environ 30000.

Ce polypeptide est obtenu à partir d'un ARN messenger transcrit à partir d'un gène déjà caractérisé comme étant celui de l'enképhalinase (EC 3.4.24.11) qui comporte 742 acides aminés. Mais, il s'agit là d'un ARN messenger obtenu par un mécanisme d'épissage alternatif qui supprime les exons 5 à 18 du gène déjà caractérisé (nomenclature selon Shipp et al., 1988 pour l'enzyme

humaine), ce qui correspond à la délétion de la séquence d'acides aminés dont l'extrémité est constituée par l'acide aminé en position 59 de l'enképhalinase forme longue à celle constituée par l'acide aminé en position 545 de l'enképhalinase forme longue. Il s'agit donc d'un polypeptide nouveau et jusqu'alors inconnu.

En d'autres termes, les séquences d'acides aminés respectives 1 à 58 et 59 à 255 des polypeptides de l'invention se retrouvent sur l'enképhalinase forme longue, mais sont contiguës dans les polypeptides de l'invention, alors qu'elles sont séparées dans l'enképhalinase forme longue.

Ces polypeptides de l'invention seront dans la suite désignés par "enképhalinase forme courte" ou isoforme courte de l'enképhalinase.

Selon un autre mode de caractérisation, le polypeptide de l'invention comprend dans son ossature peptidique l'enchaînement d'acides aminés codé par la séquence d'acides nucléiques représentée sur la Figure 1 et s'étendant de l'extrémité constituée par le nucléotide en position 45, à celle constituée par le nucléotide en position 809.

L'invention concerne également des protéines chimères dans lesquelles le polypeptide tel que défini plus haut ou des fragments de celui-ci sont réunis à un enchaînement d'acides aminés hétérologue par rapport à ce polypeptide.

Les polypeptides et protéines chimères de l'invention peuvent être glycosylés et peuvent comporter ou non des ponts disulfure.

Un procédé pour la production des polypeptides de l'invention comprend :

- la culture d'un hôte cellulaire compétent, auparavant transformé avec un acide nucléique contenant une séquence de nucléotides codant pour le susdit polypeptide immunogène et dans laquelle cette séquence

de nucléotides se trouve placée sous le contrôle d'éléments de régulation, dont notamment un promoteur reconnu par les polymérases de cet hôte cellulaire compétent, les éléments d'initiation et de terminaison de la traduction, et

- la récupération du polypeptide immunogène produit à partir des produits d'expression de cet hôte cellulaire.

Un autre procédé de préparation des polypeptides de l'invention est caractérisé en ce que, partant de préférence de l'acide aminé C-terminal, l'on condense successivement deux à deux les aminoacyles successifs dans l'ordre requis, ou des aminoacyles et des fragments préalablement formés et contenant déjà plusieurs résidus aminoacyles dans l'ordre approprié, ou encore plusieurs fragments préalablement ainsi préparés, étant entendu que l'on aura eu soin de protéger au préalable toutes les fonctions réactives portées par ces aminoacyles ou fragments à l'exception des fonctions amines de l'un et carboxyle de l'autre ou vice versa, qui doivent normalement intervenir dans la formation des liaisons peptidiques, notamment après activation de la fonction carboxyle, selon les méthodes connues dans la synthèse des peptides et ainsi de suite, de proche en proche, jusqu'à l'acide aminé N-terminal.

Des variantes préférées du procédé du génie génétique qui vient d'être brièvement défini et dont l'originalité réside essentiellement dans la nature de la séquence de nucléotides, dont l'expression est recherchée peuvent être envisagées.

Il permet la production des polypeptides de l'invention par voie recombinante.

L'invention concerne également les acides nucléiques (acides désoxyribonucléiques ou acides ribonucléiques), susceptibles de s'hybrider avec la séquence complémentaire de l'un des acides nucléiques

codant pour l'un quelconque des polypeptides précédemment définis, dans les conditions d'hybridation décrites par Maniatis et al., "Molecular cloning", Cold Spring Harbor Laboratory (1982).

L'invention concerne également des acides nucléiques qui comprennent ou qui sont constitués par un enchaînement de nucléotides codant pour l'un quelconque des polypeptides précédemment définis.

L'invention concerne en particulier les acides nucléiques contenant la séquence représentée sur la Figure 1, s'étendant de l'extrémité constituée par le nucléotide en position 45 à celle constituée par le nucléotide en position 809.

L'invention concerne également les acides nucléiques contenant la séquence définie par l'enchaînement représenté sur la Figure 1, s'étendant de l'extrémité constituée par le nucléotide en position 1 à celle constituée par le nucléotide en position 822.

Des acides nucléiques avantageux de l'invention sont constitués par :

- l'enchaînement représenté sur la Figure 1 s'étendant de l'extrémité constituée par le nucléotide en position 1 à celle constituée par le nucléotide en position 822,
- l'enchaînement représenté sur la Figure 1 s'étendant de l'extrémité constituée par le nucléotide en position 45 à celle constituée par le nucléotide en position 809.

Font également partie de l'invention les acides nucléiques variants par rapport à ceux sus-définis et qui comportent certaines mutations localisées dans la mesure où ces acides nucléiques variants s'hybrident avec les acides nucléiques précédemment définis ou avec les sondes nucléiques définies ci-après dans les conditions d'hybridation définies ci-après dans la description.

Font également partie de l'invention les acides nucléiques complémentaires des acides nucléiques précédemment définis.

Les acides nucléiques de l'invention peuvent être préparés soit par un procédé chimique, soit par d'autres procédés.

Un mode de préparation approprié des acides nucléiques (comportant au maximum 200 nucléotides - ou pb, lorsqu'il s'agit d'acides nucléiques bicaténaires) de l'invention par voie chimique comprend les étapes suivantes :

- la synthèse d'ADN en utilisant la méthode automatisée de  $\beta$ -cyanéthyl phosphoramidite décrite dans Bioorganic Chemistry 4; 274-325, 1986,
- le clonage des ADN ainsi obtenus dans un vecteur plasmidien approprié et la récupération des ADN par hybridation avec une sonde appropriée.

Un mode de préparation, par voie chimique, d'acides nucléiques de longueur supérieure à 200 nucléotides - ou pb (lorsqu'il s'agit d'acides nucléiques bicaténaires) comprend les étapes suivantes:

- l'assemblage d'oligonucléotides synthétisés chimiquement, pourvus à leurs extrémités de sites de restriction différents, dont les séquences sont compatibles avec l'enchaînement en acides aminés du polypeptide naturel selon le principe décrit dans Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80; 7461-7465, 1983,
- le clonage des ADN ainsi obtenus dans un vecteur plasmidien approprié et la récupération de l'acide nucléique recherché par hybridation avec une sonde appropriée.

Un autre procédé de préparation des acides nucléiques de l'invention à partir d'ARNm comprend les étapes suivantes :

- préparation d'ARN cellulaire à partir de tout tissu exprimant l'isoforme courte de l'enképhalinase selon les techniques décrites par Maniatis et al., "Molecular



cloning", Cold Spring Harbor Laboratory (1982), et Ausubel F.M. et al. Current Protocols in Molecular Biology, chapitre 4, Green Publishing Associates et Wiley-Interscience, New York (1989),

- récupération et purification des ARNm par passage des ARN cellulaires totaux par chromatographie avec un oligodT immobilisé,
- synthèse d'un brin d'ADNc à partir des ARNm purifiés d'après la technique décrite dans Gene 25:263, 1983,
- clonage des acides nucléiques ainsi obtenus dans un vecteur plasmidien approprié et récupération de la séquence nucléotidique recherchée en utilisant une sonde d'hybridation appropriée.

Pour préparer les acides nucléiques de l'invention, les sondes d'hybridation oligonucléotidiques synthétisées chimiquement sont celles qui sont constituées de deux enchaînements l'un à la suite de l'autre, non séparés par d'autres acides aminés, c'est-à-dire :

- un premier enchaînement contenu dans la séquence d'acides nucléiques représentée sur la Figure 1, s'étendant de l'extrémité constituée par le nucléotide en position 204 à celle constituée par le nucléotide en position 219,
- et un deuxième enchaînement contenu dans la séquence d'acides aminés représentée sur la Figure 1, s'étendant de l'extrémité constituée par le nucléotide en position 220 à celle constituée par le nucléotide en position 230.

Ce sont des séquences qui ont été dérivées de celles de la Figure 1 et elles peuvent être utilisées dans les conditions d'hybridation décrites par Maniatis et al. (1982) déjà cité.

La synthèse du brin d'ADNc et son amplification subséquente in vitro peut également être effectuée en utilisant la méthode PCR (Polymerase Chain Reaction), comme décrit par exemple par Goblet et al. Nucleic Acid

Research, 17, 2144, 1989 "One step amplification of transcripts in total RNA using Polymerase Chain Reaction", en utilisant deux amplimères chimiquement synthétisés définis à partir de la séquence de la Figure 1. Des amplimères appropriés sont par exemple :

- celui défini sur la Figure 1, du nucléotide en position 1 au nucléotide en position 33 (amorce 2), et celui défini sur la Figure 1, du nucléotide en position 799 au nucléotide en position 822 (amorce 1),
- celui défini sur la Figure 1, du nucléotide en position 299 au nucléotide en position 322 et l'amorce 2 ci-dessus définie,
- celui défini sur la Figure 1, du nucléotide en position 204 au nucléotide en position 230 et l'amorce 1 ci-dessus définie.

Le fragment d'acides nucléiques amplifié peut être ensuite cloné selon les techniques décrites dans Ausubel F.M. et al. (1989) déjà cité.

L'invention concerne également les vecteurs recombinants, en particulier pour le clonage et/ou l'expression, notamment du type plasmide, cosmide, phage, ou virus, contenant un acide nucléique de l'invention en l'un de ses sites non essentiels pour sa répllication.

Un vecteur approprié de l'invention, contient en l'un de ses sites non essentiels pour sa répllication des éléments nécessaires pour promouvoir l'expression d'un polypeptide selon l'invention, dans un hôte cellulaire et éventuellement un promoteur reconnu par les polymérases de l'hôte cellulaire, en particulier un promoteur inductible et éventuellement une séquence signal et une séquence d'ancrage.

L'invention concerne également un hôte cellulaire transformé par un vecteur recombinant défini précédemment comprenant les éléments de régulation permettant l'expression de la séquence nucléotidique

codant pour l'un des polypeptides selon l'invention dans cet hôte.

Par hôte cellulaire on entend tout organisme susceptible d'être maintenu en culture.

L'un des microorganismes utilisés peut être constitué par une bactérie, notamment E. coli.

Un organisme de choix est constitué par la cellule CHO.

Mais d'autres organismes peuvent être utilisés tout aussi aisément, naturellement sous réserve que l'on dispose pour chacun d'entre eux des vecteurs, notamment plasmidiques ou viraux, susceptibles de s'y répliquer et des séquences de nucléotides insérables dans ces vecteurs et capables, lorsqu'elles sont suivies dans ces vecteurs par un insérat codant pour un polypeptide de l'invention, d'assurer l'expression de cet insérat dans les organismes choisis et leur transport dans les membranes de ces hôtes cellulaires.

L'invention concerne également les anticorps, notamment monoclonaux, dirigés de façon spécifique contre l'un des polypeptides de l'invention, et qui ne reconnaissent pas l'enképhalinase décrite dans la demande de brevet EP n° 272928. En particulier, ces anticorps reconnaissent la séquence d'acides aminés représentée sur la Figure 1, s'étendant de l'acide aminé en position 54 à l'acide aminé en position 64.

Pour obtenir les anticorps, on peut injecter chez l'animal l'un des susdits polypeptides.

On prépare des anticorps monoclonaux par fusion cellulaire entre des cellules de myélome et des cellules spléniques de souris immunisées, selon les procédés classiques.

Les anticorps de l'invention peuvent être utilisés pour purifier l'isoforme courte de l'enképhalinase à partir de tissus ou de cellules où elle est exprimée ou bien encore dans un but diagnostique.

L'invention concerne également les sondes nucléotidiques synthétiques ou non, s'hybridant avec l'un des acides nucléiques définis ci-dessus ou leurs séquences complémentaires ou leur ARN correspondant, et qui ne s'hybride pas avec les gènes ou l'ARN messager codant pour l'enképhalinase décrite dans la demande de brevet EP n° 272928.

Les sondes de l'invention comportent au minimum 10, avantageusement 15 acides nucléiques et peuvent comporter au maximum la totalité de la séquence nucléotidique représentée sur la Figure 1.

Pour les sondes les plus courtes, c'est-à-dire d'environ 10 à environ 100 nucléotides, des conditions d'hybridation appropriées sont les suivantes:

900mM de NaCl, 90mM de tri-sodium citrate pH 7,0, 100µg/ml d'ADN de sperme de saumon, 0,05% de pyrophosphate de sodium, 10 à 25% de formamide déionisée, 0,02% de Ficoll (Pm de 400.000), 0,02% d'albumine de sérum bovine, 0,02% de polyvinylpyrrolidone, pendant 14 à 16 heures à 42°C.

Pour les sondes les plus longues, c'est-à-dire présentant plus d'environ 100 nucléotides, des conditions d'hybridation appropriées sont les suivantes:

600mM de NaCl, 60mM de tri-sodium citrate, 20µg/ml d'ADN de sperme de saumon, 20µg/ml d'ARNt de levure, 8mM de Tris-HCl pH 7,4, 40 à 60% de formamide déionisée, 0,02% de Ficoll, 0,02% d'albumine de sérum bovine, 0,02% de polyvinylpyrrolidone, 0,2% de sodium dodécyl sulfate, 10% de sulfate de dextrane.

L'invention concerne en particulier les sondes constituées de deux enchaînements l'un à la suite de l'autre, non séparés par d'autres acides nucléiques, c'est-à-dire :

- un premier enchaînement contenu dans la séquence d'acides nucléiques représentée sur la Figure 1, s'étendant de l'extrémité constituée par le nucléotide

en position 204 à celle constituée par le nucléotide en position 219,

- et un deuxième enchaînement contenu dans la séquence d'acides aminés représentée sur la Figure 1, s'étendant de l'extrémité constituée par le nucléotide en position 220 à celle constituée par le nucléotide en position 230.

L'invention concerne en particulier la sonde nucléotidique suivante :

GAC TGC ATA AAA TCA GTC TTC CCC GCC

Les sondes de l'invention peuvent être utilisées comme outils de diagnostic in vitro d'affections mettant en jeu un épissage alternatif anormal.

L'invention concerne également un procédé de diagnostic in vitro d'affections mettant en jeu un épissage alternatif anormal, dans lequel on utilise l'une ou plusieurs quelconques des sondes définies selon l'invention,

comprenant les étapes suivantes :

- l'amplification préalable possible des quantités de séquence nucléotidique selon l'invention susceptible d'être contenue dans un échantillon biologique prélevé sur un patient, au moyen d'amorces d'ADN,

- la mise en contact de l'échantillon biologique indiqué ci-dessus avec une sonde nucléotidique constituée de deux enchaînements dans le prolongement l'un de l'autre, c'est-à-dire :

- un premier enchaînement contenu dans la séquence d'acides nucléiques représentée sur la Figure 1, s'étendant de l'extrémité constituée par le nucléotide en position 204 à celle constituée par le nucléotide en position 219,

- et un deuxième enchaînement contenu dans la séquence d'acides aminés représentée sur la Figure 1, s'étendant de l'extrémité constituée par le nucléotide en position 220 à celle constituée par le nucléotide en position 230,

et en particulier la sonde nucléotidique suivante :

GAC TGC ATA AAA TCA GTC TTC CCC GCC

ou leur séquence nucléotidique complémentaire,

dans des conditions permettant la production d'un complexe d'hybridation formé de ladite sonde et ladite séquence nucléotidique,

- la détection du complexe d'hybridation ci-dessus qui a pu se former.

L'invention concerne également un procédé d'identification de tissus où les susdits polypeptides sont exprimés de façon exclusive ou prédominante, pour l'identification ou la mise au point d'inhibiteurs de l'activité enzymatique des susdits polypeptides.

Par "inhibiteur de l'activité enzymatique d'un polypeptide de l'invention", on désigne un composé chimique comprenant notamment un groupe chélateur du zinc, et susceptible en concentration modérée d'inhiber l'activité peptidasique desdits polypeptides principalement celui désigné par enképhalinase forme courte.

L'expression "exprimé de façon prédominante" signifie que l'enképhalinase est exprimée à la fois sous la forme longue et à la fois sous la forme courte, l'activité de l'enképhalinase "forme courte" de l'invention représentant au moins environ 50% par rapport à l'activité de l'enképhalinase totale exprimée.

Ce procédé d'identification de tissus tels que ceux du lobe intermédiaire de l'hypophyse, où le polypeptide de l'invention est exprimé de façon exclusive ou prépondérante, pour la mise au point d'inhibiteurs de l'activité enzymatique des polypeptides de l'invention peut impliquer l'utilisation d'une ou plusieurs sondes selon l'invention, et il comprend alors les étapes suivantes:

- l'amplification préalable possible des quantités de séquence nucléotidique selon l'invention susceptible d'être contenue dans un échantillon biologique au moyen d'amorces d'ADN,
  - la mise en contact de l'échantillon biologique indiqué ci-dessus avec une sonde nucléotidique constituée de deux enchaînements dans le prolongement l'un de l'autre, c'est-à-dire :
    - un premier enchaînement contenu dans la séquence d'acides nucléiques représentée sur la Figure 1, s'étendant de l'extrémité constituée par le nucléotide en position 204 à celle constituée par le nucléotide en position 219,
    - et un deuxième enchaînement contenu dans la séquence d'acides aminés représentée sur la Figure 1, s'étendant de l'extrémité constituée par le nucléotide en position 220 à celle constituée par le nucléotide en position 230,
- et en particulier la sonde nucléotidique suivante :
- GAC TGC ATA AAA TCA GTC TTC CCC GCC
- ou leur séquence nucléotidique complémentaire,
- dans des conditions permettant la production d'un complexe d'hybridation formé de ladite sonde et ladite séquence nucléotidique,
- la détection du complexe d'hybridation ci-dessus qui a pu se former.

Ce procédé d'identification de tissus tels que le lobe intermédiaire de l'hypophyse, où le polypeptide de l'invention est exprimé de façon exclusive ou prépondérante, pour la mise au point d'inhibiteurs de l'activité enzymatique des polypeptides de l'invention peut également impliquer l'utilisation d'un ou plusieurs anticorps selon l'invention, et il comprend alors les étapes suivantes :

- la mise en contact d'un anticorps selon l'invention avec un prélèvement biologique dans des conditions permettant la production éventuelle d'un complexe

immunologique formé entre le polypeptide de l'invention ou produit qui en a dérivé et l'anticorps de l'invention,

- la détection du susdit complexe immunologique formé.

L'invention a également pour objet des médicaments contenant à titre de substance active des inhibiteurs des susdits polypeptides.

L'invention sera mieux comprise à la lecture des exemples suivants, qui n'ont qu'un caractère illustratif et nullement limitatif de l'invention.

EXEMPLE 1 : Séquençage d'un polypeptide de 255 acides aminés (enképhalinase forme courte) :

On peut mettre en évidence l'ARN messager du polypeptide de 255 acides aminés représenté sur la Figure 1 en synthétisant un ADNc simple brin à partir d'une amorce spécifique et d'ARN messagers tissulaires, et en amplifiant par PCR le fragment ainsi obtenu entre deux amorces définies, par exemple : on synthétise deux amorces dérivées de la séquence de l'enképhalinase (neutral endopeptidase 3.4.24.11) situées aux extrémités 5' et 3' du gène (synthétiseur d'ADN PCR-mate 391 A, Applied Biosystems) : position 1-33 (Figure 1), 5'-G CTG AGG CGA GGG ATT TTA CGT GAT, amorce 2 et position 799-822 (Figure 1) 5'-CCT GTG AAG ATC ACC AAA CCC GAC, amorce 1 utilisées à la concentration de 384nM.

On synthétise un ADNc monobrin en utilisant de la reverse transcriptase AMV (20U, Boehringer) et de l'ARN total (5µg) d'intestin de rat en présence de l'amorce 1 à 384nM. Cette matrice est ensuite amplifiée en utilisant les amorces 1 et 2 à 75nM pendant 35 cycles (92°C, 54°C, 72°C pendant 1mn, 1mn et 4mn respectivement) avec 2.5U d'ADN Polymerase Taq (Perkin Elmer Cetus).

Après résolution des produits qui ont été obtenus par la technique PCR par électrophorèse sur gel d'agarose, transfert et hybridation avec la sonde



enképhalinase de rat dirigée contre la partie allant du site à zinc (300) jusqu'à l'extrémité 3' de la partie codante (822), une bande réactive est excisée à 800b, et on extrait l'ADN. Cet ADN est amplifié à nouveau par technique PCR avec une amorce située au niveau du site à zinc (position 299-322, Figure 1) 5'-G GTC ATC GGA CAT GAA ATC ACA CA) et l'amorce 2. Une bande de 300 bases est détectée après coloration au bromure d'éthidium, découpée, l'ADN est extrait. On obtient un ADN à bouts francs après action de l'ADN polymérase de E. coli en présence de nucléotides et d'ions  $Mg^{++}$ . Puis cet ADN est phosphorylé par la T4 Poly nucléotide kinase, puis introduit dans le plasmide pGEM 4Z (Promega) afin d'être séquencé (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74, 5463).

La séquence obtenue révèle notamment l'existence de deux enchaînements d'acides nucléiques correspondant respectivement à l'exon 4 et à l'exon 19 de l'enképhalinase forme longue, ces deux enchaînements d'acides nucléiques étant raccordés directement entre eux dans la séquence ci-dessus obtenue, c'est-à-dire étant l'un côte à côte de l'autre, sans qu'il y ait d'autres acides nucléiques les séparant. Une amorce 4 (position 204-230, Figure 1) 5'-GA CTG CAT AAA ATC AGT CTT CCC CGCC) correspondant à ce raccordement, c'est-à-dire constituée d'une partie de l'enchaînement de nucléotides appartenant à l'exon 4 et d'une partie de l'enchaînement de nucléotides appartenant à l'exon 19, est synthétisée. Les amorces 1 et 4 (correspondant à la partie 3' et contenant le codon stop TGA) sont ensuite utilisées dans la technique RT-PCR comme décrit ci-dessus, utilisant l'ARN total d'intestin comme source d'ARN.

Une bande de taille prévue (618b) est extraite après électrophorèse sur gel d'agarose puis traitée comme décrit ci-dessus avant d'être sous clonée dans pGEM 4Z pour être séquencée.

La séquence de cet ADN correspond à celle de l'ADN de l'enképhalinase forme longue, dans laquelle les enchaînements d'acides aminés correspondant aux exons 5 à 18 ont été éliminés.

#### EXEMPLE 2 :

Afin de caractériser cette nouvelle activité enzymatique, on a exprimé l'ADNc dans des cellules de mammifères à l'aide d'un vecteur d'expression.

Cette expression permet d'obtenir de grandes quantités d'enzyme et ainsi de mesurer son activité, de caractériser sa spécificité de substrat et de définir l'action d'inhibiteurs.

#### Méthode

Les vecteurs d'expression dérivent du plasmide pSV  $\beta_2$ -MDH (Emorine, L., Marullo, S., Delavier-Klutchko, C., Kaveri, S.V., Durieu-Trautmann, O. et Strosberg, A.D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6995-6999 (1987). Le récepteur adrénergique  $\beta_2$  est excisé de pSV  $\beta_2$ -MDH par digestion avec Hind III, EcoRI et remplacé par un fragment de restriction SmaI-EcoRI du clone du récepteur D-2A (Giros, B., Sokoloff, P., Martres, M.P., Riou, J.F., Emorine, L.J. et Schwartz, J.C. Nature 342. 923-926 (1989) en utilisant un adaptateur de nucléotide franc-Hind III conduisant au plasmide pSVD<sub>2</sub>.

Le vecteur pour exprimer la forme courte de l'enképhalinase est obtenu en remplaçant le fragment de restriction Hind III-BglII pSV D<sub>2</sub> par la construction suivante : les deux fragments obtenus après PCR décrit précédemment sont coupés par l'enzyme de restriction NaeI et ligués entre eux pour générer l'ADNc codant entier.

Cette construction est montée dans le site SmaI de pGEM 42 puis excisée par EcoRV et Pst I puis liguée à des adaptateurs francs Hind III et PstI-BamHI respectivement. Le morceau généré Hind III-BamHI est ensuite introduit dans le pSV D<sub>2</sub> Hind III-BglII.

Ces constructions sont cultivées et purifiées sur gradient de chlorure de césium (Sambrook J. et al., Molecular cloning - a laboratory manual. C. Nolan, ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) et transfectées (45) à des cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO-K1) anormales en dihydrofolate réductase. Les transfectants stables sont sélectionnés dans un milieu de culture (Dubelcco's Modified Eagle medium) sans hypoxanthine et sans thymidine.

Sur les cellules transfectées on met en évidence une activité peptidasique nouvelle, absente des cellules témoins. On utilise pour ce faire divers substrats tels que la (Met<sup>5</sup>)enképhaline ou la (D-Ala<sup>2</sup>, Leu<sup>5</sup>) enképhaline, radioactive selon Vogel et Altstein (FEBS Lett. 1979, 98, 44). On peut aussi utiliser des substrats modèles tels que Suc-Ala-Ala-Phe-amidométhylcoumarine selon Gros et al. (Proc. Natl. Acad. Sci., 1989, 86, 7580). Cette activité peptidasique est entièrement inhibée par des agents chélateurs tels que l'EDTA ou des inhibiteurs de métallopeptidases tels que le thiorphan à une concentration élevée (0,1mM). Toutefois, le thiorphan à une concentration de 0,1μM, suffisante pour inhiber complètement la forme longue de l'enképhalinase, n'affecte pas significativement l'activité de la forme courte.

On peut en déduire que la spécificité enzymatique de la forme courte est fortement modifiée par rapport à celle de la forme longue, notamment en ce qui concerne l'affinité d'inhibiteurs caractéristiques.

Ainsi, les cellules transfectées par cette forme courte représentent (de même que les tissus dans lesquels celle-ci est exprimée de manière exclusive ou prédominante) des matériels utiles pour la mise au point d'une nouvelle classe d'inhibiteurs de métallopeptidase.

EXEMPLE 3 : localisation de l'enképhalinase forme courte :

La localisation de l'ARNm de l'isoforme courte de l'enképhalinase dans différents tissus peut être réalisée selon une méthode d'hybridation in situ à l'aide d'une sonde oligonucléotidique très spécifique, qui, dans des conditions données, ne va s'hybrider qu'avec la forme courte.

Par exemple, l'oligonucléotide GAC TGC ATA AAA TCA GTC TTC CCC GCC est marqué, en sa partie 3'-terminale, à l'aide de la terminale-transférase et d'ATP <sup>35</sup>S (1000 Ci/mmol) avec une activité spécifique de 310<sup>8</sup>cpm/μg.

Différents organes (cerveau, intestin, rein, surrénales, pancréas, etc....) sont prélevés et immédiatement congelés par immersion pendant 30mn dans du monochlorodifluorométhane (Prestogaz R22).

Ils sont ensuite conservés, pendant une durée de 1 jour minimum à quelques semaines maximum à -80°C avant d'être coupés.

Des coupes de 10μm sont réalisées à l'aide d'un cryostat (Bright Instrument Company Ltd) montées sur des lames gélatinées (gélatine 0,1%) puis conservées à -80°C, en présence de desséchant jusqu'à l'utilisation.

Au moment de l'expérience, les coupes, encore congelées, sont immergées dans du paraformaldéhyde (4%) pendant 15mn à température ambiante puis rincées par trempage rapide dans 2 bains successifs de PBS 0,1M et séchées sous un courant d'air comprimé.

50μl de milieu d'hybridation (50% formamide, 0,6M NaCl, 1 x Dehnardt, 10mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA 0,5mg/ml ARNt de levure, 10mM dithiothreitol) contenant l'oligonucléotide radioactif (200.000 cpm/50μl) sont déposés sur les coupes sèches et recouverts d'une pellicule. L'hybridation est réalisée pendant 24h à 42°C dans une enceinte humidifiée par du formamide/50%).

Pour le lavage, on enlève la pellicule par trempage (2 x SSC, 1mM dithiothreitol) puis 4 fois 15mn (2 x SSC/formamide 50%/1mM dithiothreitol) à 42°C, 4 fois 15mn (0.2 x SSC/1mM dithiothreitol) à 55°C et 2 fois 30mn (0.1 x SSC/1mM dithiothreitol) à température ambiante.

Les coupes sont ensuite déshydratées 2 fois 2mn à l'aide d'éthanol 30%/0.3M acétate d'ammonium/1mM dithiothreitol, 2 fois 2mn à l'aide de l'éthanol 60%, acétate d'ammonium 0.3M, 1mM dithiothreitol, 2 fois 2mn à l'aide d'éthanol 95%, acétate d'ammonium 0.3M, 1mM dithiothreitol et enfin 2 fois 2mn à l'aide d'éthanol absolu.

Les coupes sont ensuite séchées sous un courant d'air comprimé.

Pour la révélation, les coupes sont apposées sur des films (commercialisés sous le nom d'hyperfilms  $\beta$ -max, Amersham) dans des cassettes d'autoradiographie munies d'écrans amplificateurs, maintenues à -80°C pendant le temps nécessaire.

Le marquage peut aussi être mis en évidence par microautoradiographie.

Les lames sont alors trempées dans une émulsion photographique liquide (Ilford K5 ou Amersham EM1), maintenue à 43°C, puis conservées le temps nécessaire à 4°C en présence de desséchant, à l'abri de la lumière.

Les lames sont ensuite révélées pendant 90 secondes dans un révélateur commercialisé sous le nom Dektol (Kodak) dilué au 1/3 à 17°C, rincées dans de l'eau distillée glacée puis fixées pendant 10mn dans du fixateur rapide (Kodak) diluée au 1/4 et maintenu à 4°C.

Les lames sont ensuite lavées à l'eau courante pendant 1 heure et séchées 24 heures à température ambiante à l'abri de la poussière. Une coloration appropriée pour le tissu étudié peut alors être réalisée.

A l'aide de cette sonde, la présence d'ARNm de l'isoforme courte de l'enképhalinase a pu être observée dans différents organes chez le rat.

Au niveau du cerveau, le lobe intermédiaire de l'hypophyse est fortement réactif alors que le striatum, riche en ARNm, de l'isoforme longue de l'enképhalinase, semble vide. De plus, l'analyse microautoradiographique du lobe intermédiaire de l'hypophyse indique que toutes les cellules endocrines expriment l'ARNm de l'isoforme courte.

Le tractus gastrointestinal est la région où les plus fortes concentrations d'ARNm de l'isoforme courte ont pu être observées. Au niveau du duodenum et du jejunum tout particulièrement, on observe un nombre discret de cellules épithéliales positives localisées dans les villosités intestinales et à la base des cryptes. Les couches plus profondes, musculaire muqueuse, sous muqueuses et muscles paraissent dénuées de réactivité.

Par ailleurs, la distribution tissulaire de l'isoforme courte de l'enképhalinase a été établie par RT-PCR en utilisant les amorces n° 1 et 4 définies ci-dessus.

L'ARN messenger de l'isoforme courte de l'enképhalinase est ainsi mis en évidence dans divers tissus où celui de l'isoforme longue de l'enképhalinase est présent : il s'agit de l'intestin, du rein, poumon, coeur, cerveau, etc..... Cependant, au niveau du lobe intermédiaire de l'hypophyse, seul le messenger de l'isoforme courte est mis en évidence indiquant que les cellules produisant de l'hormone  $\alpha$ -MSH à partir de la proopiomélanocortine expriment sélectivement la forme courte de l'enképhalinase. Ces cellules sont marquées à l'aide d'un anticorps monoclonal mAb85 A<sub>2</sub> (Pollard et al., Neuroscience, 1989, 30, 339) dirigé contre l'enképhalinase. Cet anticorps peut être dès lors utilisé pour immunoprécipiter sélectivement la protéine

correspondant à l'isoforme courte à partir de membranes solubilisées selon une technique décrite par Pollard et al. (Eur. J. Pharmacol. 1987, 133, 155) et la caractériser. En outre, les membranes brutes du lobe neurointermédiaire de l'hypophyse constituent une source d'activité peptidasique correspondant sélectivement à l'isoforme courte de l'enképhalinase.

### REVENDICATIONS

1. Polypeptide ayant une activité enzymatique contenant :

. la séquence de 255 acides aminés de la Figure 1,

. ou un variant de cette séquence, ce variant étant tel qu'il résulte de l'addition, de la suppression ou du remplacement d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que le variant soit une métallopeptidase présentant la même spécificité que ladite séquence vis-à-vis de substrats et inhibiteurs.

2. Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est constitué par la séquence, représentée sur la Figure 1, s'étendant de l'extrémité constituée par l'acide aminé en position 1 à celle constituée par l'extrémité en position 255.

3. Acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend ou est constitué par un enchaînement de nucléotides codant pour les polypeptides selon l'une quelconque des revendications 1 et 2.

4. Acide nucléique selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il comprend ou est constitué par l'enchaînement de nucléotides représenté sur la Figure 1, s'étendant de l'extrémité constituée par le nucléotide en position 1 à celle constituée par le nucléotide en position 822, ou est constitué par l'enchaînement de nucléotides représenté sur la Figure 1, s'étendant de l'extrémité constituée par le nucléotide en position 45 à celle constituée par le nucléotide en position 809.

5. Vecteur recombinant, en particulier pour le clonage et/ou l'expression, notamment du type plasmide, cosmide, phage ou virus, caractérisé en ce qu'il contient un acide nucléique selon l'une des revendications 3 ou 4 en l'un de ses sites non essentiels pour sa répllication.



6. Vecteur recombinant selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il contient en l'un de ses sites non essentiels pour sa répllication des éléments nécessaires pour promouvoir l'expression d'une séquences d'acides aminés selon les revendications 1 ou 2, dans un hôte cellulaire et éventuellement un promoteur reconnu par les polymérases de l'hôte cellulaire, en particulier un promoteur inductible et éventuellement une séquence signal et une séquence d'ancrage.

7. Hôte cellulaire transformé par un vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 5 ou 6 et comprenant les éléments de régulation permettant l'expression de la séquence nucléotidique codant pour le polypeptide selon l'une des revendications 1 ou 2 dans cet hôte.

8. Hôte cellulaire transformé selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les bactéries, notamment E. coli.

9. Hôte cellulaire transformé selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il s'agit de cellules CHO.

10. Anticorps caractérisé(s) en ce qu'il(s) est (ou sont) dirigé(s) de façon spécifique contre un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, et en ce qu'il(s) ne reconnaît (ou reconnaissent) pas l'enképhalinase décrite dans la demande de brevet EP n° 272928, et en particulier celui ou ceux reconnaissant les séquences d'acides aminés suivantes: .  
- celle définie par la séquence d'acides aminés représentée sur la Figure 1 s'étendant de l'extrémité constituée par l'acide aminé en position 54 à celle constituée par l'acide aminé en position 64.

11. Sonde nucléotidique caractérisée en ce qu'elle s'hybride avec l'un des acides nucléiques selon les revendications 3 ou 4 ou leur séquence complémentaire dans les conditions d'hybridation telles qu'elle ne

s'hybride pas avec les gènes ou ARN messager de l'enképhalinase décrite dans la demande EP n° 272928, en ce qu'elles sont constituées de deux enchaînements dans le prolongement l'un de l'autre, c'est-à-dire :

- un premier enchaînement contenu dans la séquence d'acides nucléiques représentée sur la Figure 1, s'étendant de l'extrémité constituée par le nucléotide en position 204 à celle constituée par le nucléotide en position 219,

- et un deuxième enchaînement contenu dans la séquence d'acides aminés représentée sur la Figure 1, s'étendant de l'extrémité constituée par le nucléotide en position 220 à celle constituée par le nucléotide en position 230,

et en particulier la sonde nucléotidique suivante :

GAC TGC ATA AAA TCA GTC TTC CCC GCC

ou leur séquence nucléotidique complémentaire.

12. Procédé de diagnostic in vitro d'affections mettant en jeu un épissage alternatif anormal, dans lequel on utilise l'une ou plusieurs quelconques des sondes définies selon la revendication 11, comprenant les étapes suivantes :

- l'amplification préalable possible des quantités de séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 3 ou 4 susceptible d'être contenue dans un échantillon biologique prélevé sur un patient, au moyen d'amorces d'ADN,

- la mise en contact de l'échantillon biologique indiqué ci-dessus avec une sonde nucléotidique selon la revendication 11,

dans des conditions permettant la production d'un complexe d'hybridation formé de ladite sonde et ladite séquence nucléotidique,

- la détection du complexe d'hybridation ci-dessus qui a pu se former.

13. Procédé d'identification de tissus tels que le lobe intermédiaire de l'hypophyse, où le polypeptide selon les revendications 1 ou 2 est exprimé de façon exclusive ou prépondérante, pour la mise au point d'inhibiteurs de l'activité enzymatique des polypeptides selon les revendications 1 ou 2 dans lequel on utilise une ou plusieurs sondes selon la revendication 11 comprenant les étapes suivantes :

- l'amplification préalable possible des quantités de séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 3 ou 4 susceptible d'être contenue dans un échantillon biologique, au moyen d'amorces d'ADN,
- la mise en contact de l'échantillon biologique indiqué ci-dessus avec une sonde nucléotidique selon la revendication 11,

dans des conditions permettant la production d'un complexe d'hybridation formé de ladite sonde et ladite séquence nucléotidique,

- la détection du complexe d'hybridation ci-dessus qui a pu se former.

14. Procédé d'identification de tissus tels que le lobe intermédiaire de l'hypophyse, où le polypeptide selon les revendications 1 ou 2 est exprimé de façon exclusive ou prépondérante, pour la mise au point d'inhibiteurs de l'activité enzymatique des polypeptides selon les revendications 1 ou 2 dans lequel on utilise un ou plusieurs anticorps selon la revendication 10 comprenant les étapes suivantes :

- la mise en contact d'un anticorps selon la revendication 10 avec un prélèvement biologique dans des conditions permettant la production éventuelle d'un complexe immunologique formé entre le polypeptide selon les revendications 1 ou 2 ou produit qui en a dérivé et l'anticorps selon la revendication 10,
- la détection du susdit complexe immunologique formé.

15. Médicament contenant comme substance active un inhibiteur de l'un au moins des polypeptides selon l'une des revendications 1 ou 2, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

1/2

Figure 1

|   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                |     |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----------------|-----|
| gctgaggcgagggatttttaggtgatgggaagatcagaaagtcag |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | ATG GAT        | 50  |
|   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | Met Asp<br>(1) |     |
| ATT   | ACT | GAT | ATC | AAT | GCT | CCA | AAG | CCG | AAG | AAG | AAA | CAG |                | 89  |
| Ile   | Thr | Asp | Ile | Asn | Ala | Pro | Lys | Pro | Lys | Lys | Lys | Gln |                |     |
| CGA   | TGG | ACT | CCA | CTG | GAG | ATC | AGC | CTT | TCT | GTG | CTC | GTC |                | 128 |
| Arg   | Trp | Thr | Pro | Leu | Glu | Ile | Ser | Leu | Ser | Val | Leu | Val |                |     |
| TTG   | CTC | CTG | ACT | ATC | ATA | GCT | GTG | ACA | ATG | ATT | GCT | CTC |                | 167 |
| Leu   | Leu | Leu | Thr | Ile | Ile | Ala | Val | Thr | Met | Ile | Ala | Leu |                |     |
| TAT   | GCA | ACC | TAT | GAT | GAT | GGT | ATT | TGC | AAA | TCA | TCA | GAC |                | 206 |
| Tyr   | Ala | Thr | Tyr | Asp | Asp | Gly | Ile | Cys | Lys | Ser | Ser | Asp |                |     |
| TGC   | ATA | AAA | TCA | GTC | TTC | CCC | GCC | GGC | ATT | TTG | CAG | CCC |                | 245 |
| Cys   | Ile | Lys | Ser | Val | Phe | Pro | Ala | Gly | Ile | Leu | Gln | Pro |                |     |
| CCA   | TTC | TTT | AGT | GCT | CGG | CAG | TCC | AAC | TCA | TTG | AAC | TAT |                | 284 |
| Pro   | Phe | Phe | Ser | Ala | Arg | Gln | Ser | Asn | Ser | Leu | Asn | Tyr |                |     |
| GGG   | GGC | ATC | GGC | ATG | GTC | ATC | GGA | CAT | GAA | ATC | ACA | CAT |                | 323 |
| Gly   | Gly | Ile | Gly | Met | Val | Ile | Gly | His | Glu | Ile | Thr | His |                |     |
| GGC   | TTT | GAT | GAC | AAT | GGC | AGA | AAT | TTT | AAC | AAA | GAT | GGA |                | 362 |
| Gly   | Phe | Asp | Asp | Asn | Gly | Arg | Asn | Phe | Asn | Lys | Asp | Gly |                |     |
| GAC   | CTC | GTT | GAC | TGG | TGG | ACT | CAG | CAG | TCT | GCA | AAT | AAT |                | 401 |
| Asp   | Leu | Val | Asp | Trp | Trp | Thr | Gln | Gln | Ser | Ala | Asn | Asn |                |     |
| TTC   | AAA | GAC | CAA | TCC | CAG | TGT | ATG | GTG | TAC | CAG | TAT | GGA |                | 440 |
| Phe   | Lys | Asp | Gln | Ser | Gln | Cys | Met | Val | Tyr | Gln | Tyr | Gly |                |     |
| AAC   | TTT | ACA | TGG | GAC | CTA | GCA | GGT | GGA | CAG | CAT | CTC | AAT |                | 479 |
| Asn   | Phe | Thr | Trp | Asp | Leu | Ala | Gly | Gly | Gln | His | Leu | Asn |                |     |
| GGA   | ATT | AAC | ACA | CTA | GGA | GAA | AAT | ATT | GCT | GAT | AAT | GGA |                | 518 |
| Gly   | Ile | Asn | Thr | Leu | Gly | Glu | Asn | Ile | Ala | Asp | Asn | Gly |                |     |
| GGG   | ATT | GGC | CAA | GCA | TAC | AGA | GCC | TAT | CAG | AAT | TAT | GTT |                | 557 |
| Gly   | Ile | Gly | Gln | Ala | Tyr | Arg | Ala | Tyr | Gln | Asn | Tyr | Val |                |     |
| AAA   | AAG | AAT | GGT | GAA | GAA | AAA | TTA | CTC | CCT | GGA | CTT | GAC |                | 596 |
| Lys   | Lys | Asn | Gly | Glu | Glu | Lys | Leu | Leu | Pro | Gly | Leu | Asp |                |     |
| CTC   | AAT | CAC | AAA | CAA | CTA | TTC | TTC | TTG | AAC | TTT | GCC | CAG |                | 635 |
| Leu   | Asn | His | Lys | Gln | Leu | Phe | Phe | Leu | Asn | Phe | Ala | Gln |                |     |

2/2

Figure 1 (suite)

|     |     |     |     |     |     |               |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| GTG | TGG | TGT | GGA | ACC | TAC | CGG           | CCA | GAG | TAT | GCA | GTC | AAT | 674 |
| Val | Trp | Cys | Gly | Thr | Tyr | Arg           | Pro | Glu | Tyr | Ala | Val | Asn |     |
| TCC | ATT | AAA | ACA | GAT | GTA | CAC           | AGT | CCT | GGC | AAT | TTC | AGG | 713 |
| Ser | Ile | Lys | Thr | Asp | Val | His           | Ser | Pro | Gly | Asn | Phe | Arg |     |
| ATC | ATT | GGG | ACT | TTG | CAG | AAC           | TCT | GCT | GAG | TTT | GCG | GAT | 752 |
| Ile | Ile | Gly | Thr | Leu | Gln | Asn           | Ser | Ala | Glu | Phe | Ala | Asp |     |
| GCC | TTT | CAT | TGC | CGC | AAG | AAC           | TCA | TAC | ATG | AAT | CCA | GAA | 791 |
| Ala | Phe | His | Cys | Arg | Lys | Asn           | Ser | Tyr | Met | Asn | Pro | Glu |     |
| AGG | AAA | TGT | CGG | GTT | TGG | tgatcttcacagg |     |     |     |     |     | 822 |     |
| Arg | Lys | Cys | Arg | Val | Trp |               |     |     |     |     |     |     |     |

(255)

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FR 9008416  
FA 446704  
Page 1

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS  |  | Revendications<br>concernées<br>de la demande<br>examinée |
|--|--|---|
| Catégorie  | Citation du document avec indication, en cas de besoin,<br>des parties pertinentes   |   |
| Y,D  | PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES<br>OF USA.<br>vol. 86, septembre 1989, WASHINGTON US<br>pages 7103 - 7107; D'ADAMIO L. et al:<br>"Organization of the gene encoding CALLA(neutral<br>endopeptidase 24.11):Multiple minifexons and<br>separate 5'untranslated regions"<br>* le document en entier * | 1-8   |
| A,D  | ---  | 11-12   |
| Y,D  | EP-A-272928 (GENENTECH,INC.)<br>* page 14, ligne 51 - page 15, ligne 17; figure<br>2 *   | 1-8   |
| Y,D  | BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH<br>COMMUNICATIONS.<br>vol. 144, no. 1, 14 avril 1987, DULUTH,<br>MINNESOTA US<br>pages 59 - 66; MALFROY B. et al:<br>"Molecular cloning and amino acid sequence of<br>rat enkephalinase."<br>* le document en entier *  | 1-8   |
| X  | WO-A-8905353 (DANA FARBER INSTITUTE)<br>* revendications 20-23 *   | 15  |
| X  | CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 105, no. 11, 15<br>septembre 1986<br>Columbus, Ohio, USA<br>J.M. LECOMTE et al: "Pharmacological properties of<br>acetorphan ,a parenterally active "enkephalinase<br>inhibitor" ."<br>page 54; colonne de droite; ref. no. 91131U<br>* abrégé *  | 15  |
| ---  |  |   |
| -/--   |  |   |
| Date d'achèvement de la recherche  |  | Examineur   |
| 26 FEVRIER 1991  |  | LE CORNEC N.D.R.  |
| CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES  |  |   |
| X : particulièrement pertinent à lui seul  |  |   |
| Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un<br>autre document de la même catégorie   |  |   |
| A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication<br>ou arrière-plan technologique général   |  |   |
| O : divulgation non-écrite   |  |   |
| T : théorie ou principe à la base de l'invention   |  |   |
| E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure<br>à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date<br>de dépôt ou qu'à une date postérieure. |  |   |
| D : cité dans la demande   |  |   |
| I : cité pour d'autres raisons   |  |   |
| & : membre de la même famille, document correspondant  |  |   |

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE**  
établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FR 9008416  
FA 446704  
Page 2

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS  |   | Revendications<br>concernées<br>de la demande<br>examinée |
|--|---|---|
| Catégorie  | Citation du document avec indication, en cas de besoin,<br>des parties pertinentes  |   |
| A, D   | European Journal of pharmacology<br>vol. 133, 1987, AMSTERDAM<br>pages 155 - 164; Pollard H. et al:<br>"Characterization of 2 probes for the<br>localization of enkephalinase in ratbrain<br>ø3H $\eta$ thiorphan and 125I-labeled mab"<br>* page 157, alinéa 2.5 * | 1-2, 10,<br>15  |
|  |   | DOMAINES TECHNIQUES<br>RECHERCHES (Int. Cl.5)             |
|  |   |   |
| Date d'achèvement de la recherche<br>26 FEVRIER 1991   |   | Examineur<br>LE CORNEC N.D.R.                             |
| <b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b><br>X : particulièrement pertinent à lui seul<br>Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un<br>autre document de la même catégorie<br>A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication<br>ou arrière-plan technologique général<br>O : divulgation non-écrite<br>I : théorie ou principe à la base de l'invention<br>E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure<br>à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date<br>de dépôt ou qu'à une date postérieure.<br>D : cité dans la demande<br>L : cité pour d'autres raisons<br>& : membre de la même famille. document correspondant |   |   |